

Method of processing nucleic acid samples**BEST AVAILABLE COPY****Patent number:** JP8503133T**Publication date:** 1996-04-09**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** C12Q1/68**- european:** B01L3/00C6D; B01L3/02; C12Q1/68B10; C12Q1/68D4;
C12Q1/68E**Application number:** JP19930511979T 19931105**Priority number(s):** WO1993SE00929 19931105; SE19920003320
19921106**Also published as:**

WO9411529 (A)

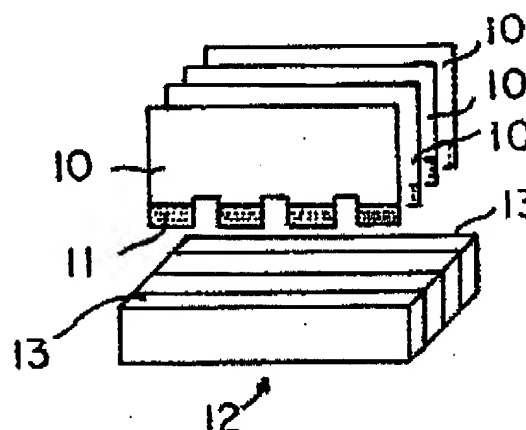
EP0672189 (A1)

US5618701 (A1)

EP0672189 (B1)

Report a data error he**Abstract not available for JP8503133T****Abstract of corresponding document: US5618701**

PCT No. PCT/SE93/00929 Sec. 371 Date May 5, 1995 Sec. 102(e) Date May 5, 1995 PCT Filed Nov. 5, 1993 PCT Pub. No. WO94/11529 PCT Pub. Date May 26, 1994A method of processing nucleic acid samples for analysis comprises the use of one or more manifolds (10) with a plurality of individual solid phase members (11) adapted for cooperation with a corresponding set or sets of receptacles (13; 15; 17). A nucleic acid species in a sample is bound to each solid phase member (11) by introducing the solid phase members into a receptacle or set of receptacles (13; 15; 17) which contain the sample or samples. Optionally, the bound nucleic acid species may be processed in a second set or sets of receptacles, and reaction products therein may be bound to the solid phase members (11) of a second manifold or manifolds. The solid phase members (11) of the first or second manifolds are then introduced into the sample receptacle or receptacles of an analyser for analyzing the nucleic acid species or reaction products, wherein nucleic acid species or reaction products are released from the solid phase members (11).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-503133

(43)公表日 平成8年(1996)4月9日

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

A 9453-4B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21)出願番号 特願平6-511979
 (86)(22)出願日 平成5年(1993)11月5日
 (85)翻訳文提出日 平成7年(1995)5月2日
 (86)国際出願番号 PCT/SE93/00929
 (87)国際公開番号 WO94/11529
 (87)国際公開日 平成6年(1994)5月26日
 (31)優先権主張番号 9203320-8
 (32)優先日 1992年11月6日
 (33)優先権主張国 スウェーデン(SE)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), JP, US

(71)出願人 ファーマシア・ビオテック・アクチエボラーグ
 スウェーデン国エス-751 82 ウプサラ
 (番地なし)
 (72)発明者 ランデグレン, ウルフ
 スウェーデン国エス-756 46 ウプサラ,
 エクソツプス ヴエイエン16
 (74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

(54)【発明の名称】 核酸試料の処理方法

(57)【要約】

分析のため、核酸試料を処理する方法は対応する1つ又は複数のセットの容器(13; 15; 17)と協同するようにした多数の個々の固相要素(11)を持つ1つ又はそれ以上のマニホールド(10)の使用を含む。試料中の核酸種は各々の固相要素(11)に、1つ又は複数の試料を含む容器又は容器のセット(13; 15; 17)の中に固相要素を導入することにより結合させる。場合により、結合した核酸種は第二の1つ又は複数のセットの容器中で処理することができ、そしてその中の反応生成物は第二の1つ又は複数のマニホールドの固相要素(11)に結合させることができる。次いで第一又は第二のマニホールドの固相要素(11)を分析器の1つ又は複数の試料容器の中に核酸種又は反応生成物を分析するため導入し、そこで核酸種又は反応生成物は固相要素(11)からはずされる。

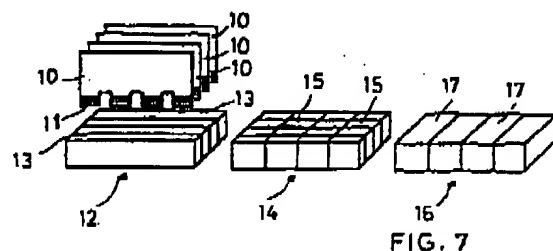


FIG. 7

(2)

特表平8-503133

【特許請求の範囲】

1. 対応する1つ又は複数のセットの容器(4; 6; 13; 15; 17)と協同するようにした多数の個々の固相要素(2; 11)を持つ1つ又は複数のマニホルド(1; 10)を準備し、

試料からの核酸種を第一の1つ又は複数のマニホルド(1; 10)の各々の固相要素(2; 11)に、固相要素を前記1つ又は複数の試料を含む第一の容器又は容器のセットに導入することにより結合させ、

場合により固相要素(2; 11)を第二の1つ又は複数のセットの容器(4; 6; 13; 15; 17)に導入することにより、各々の核酸種をそれが固相要素に結合している間に処理し、

場合により第二の1つ又は複数のマニホルド(1; 10)の固相要素(2; 11)を前記第二の容器に導入してそこに生成した1つ又は複数の種を固相要素(2; 11)に固定化し、そして

固相要素(2; 11)を分析器(8)の放出に必要な環境を与える1つ又は複数の試料容器(9)に導入することにより、核酸種又は反応生成物を1つ又は複数のマニホルドの固相要素(2; 11)から分析装置(8)へ核酸種又は反応生成物を分析するため放出する工程からなることを特徴とする分析のための核酸試料の処理方法。

2. 反応生成物が固相要素(2; 11)に結合したDNA鋳型上で合成される伸長したプライマー分子であることを特徴とする請求項1記載の方法。

3. 放出が変性手段を使用する処理により行なわれることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

4. 変性手段がホルムアミド、熱及びアルカリのような変性pH、及びそれらの組合せであることを特徴とする請求項3記載の方法。

5. 固相要素(2; 11)に結合した鋳型に対するPCRのような増幅反応を行なうことを含むことを特徴とする請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

6. 核酸種を固相要素(2; 11)に固定化することにより前記核酸種を試料から釣り上げ、そして前記核酸種を分析器に放出することを特徴とする請求項1～5の

(3)

特表平8-503133

いずれか一項記載の方法。

7. マニホールドが幾つかの例えば4つ又は8つの固相要素を形成する歯(2;11)を持つ櫛型要素(1;10)であることを特徴とする請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

8. 分析器がマニホールドの歯(2;11)を受け容れるようにした試料ウェル(9)を持つ配列決定用ゲル(8)を含むことを特徴とする請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

9. 核酸配列決定方法の一部であることを特徴とする請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

10. 診断方法の一部であることを特徴とする請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

核酸試料の処理方法

本発明は核酸の分析に関し、そしてより詳しくは分析操作のための又はその一部としての核酸試料の処理方法に関する。

核酸配列に関わる研究室的方法は現在では極めて一般的であり、そしてしばしば通常の事柄として行われている。そのような方法はとりわけハイブリッド形成及び酵素反応を含む。

通常の類いのそのような方法は増幅反応、例えばポリメラーゼ連鎖反応又はPCRと略称される反応である。周知のように、このPCR法は2つの周囲のプライマー配列を特徴とする特異なDNAセグメントに高度に特異的な増幅をもたらす。それにより、PCRは、とりわけヌクレオチド配列決定のためのDNAの十分な量を得る便利な方法を提供する。PCRの1つの主要な応用は診断目的のためである。PCRの記述については、例えばWhite, T.等、Trends in Genetics, 5巻、179ページ、1989年が参照される。

分子遺伝学反応に関連して広く使用されている固体支持体はこれまでのところ、それにより大きな合計面積が得られること及びその簡略化された取扱い及び処理方法の理由から常磁性ビーズであった。従って、例えばストレプトアビジンが固定化されたそのような磁性ビーズは商業的に入手することができる。

しかしながら、例えば磁性ビーズを固相として使用する逐次反応工程を通じて多くの試料を同時に処理することが技術的に求められており、そしてこれは反応相互間の汚染の実質的な危険を伴うものである。これはもちろん、汚染配列の増加が起こり得るPCRのような増幅が起こる状況下では特に望ましくないことである。

DD-A-279 506は化学分解による固相上のDNA配列決定（マクサムーギルバート法）のための多数のとがった先端を有する装置の使用を開示している。この装置は一組のロッドを持ち、その各々には固定化プライマーが付着しており、このロッドは一組の反応容器の中に差し込まれるように設計されている。配列決定がなされる標識したDNA断片は、ロッドをDNA断片を含むそれぞれの容器に浸

(5)

特表平8-503133

すことによりロッドに固定化される。固定化されたDNA断片のその先の処理はロッドを対応する試薬及び溶液を含む容器に浸すことにより進められ、そしてそれぞれの塩基特異試薬により分解されたDNA断片を含むそれぞれの容器の内容物は凍結乾燥され、次いでゲル電気泳動にかけられる。

Rosenthal等により上記文献で提唱された多数のとがった先端を有する装置の使用は、例えば常磁性ビーズ又はマイクロタイターウェルのような別々の固相要素の使用に関連するいくつかの問題を上手に回避していることが容易に理解される。しかしながら、この「パトリックスーマトリックス」型処理法の問題点は、その適用を制限することになる、個々のとがった先端が十分な結合能力を具えることであった。

これに関連して、固体支持体のセット(パトリックス)が対応する反応ウェルのセット(マトリックス)と協同して動くのを可能にする同様の「パトリックスーマトリックス」戦略は以前ペプチド合成に適用されていることを挙げることができる。もちろん、多数の試料の同時処理が可能な型の多数のとがった先端のある固体支持体も免疫検定法に適用される物が市販されている。

従って、上述の多数のとがった先端を有する装置を使用する核酸

試料の操作は、著しく操作を簡略化し、そしてかなりな程度まで混同と汚染の危険を減らすことができるが、それでもなお、反応生成物を固体支持体からはずし、そしてそれを問題の分析装置に移す比較的厄介な操作が残る。

本発明においては、核酸試料の分析において多数のとがった先端の固体支持体の使用におけるもう一段の改良が提唱されており、その改良とは分析される反応生成物の固体支持体からの放出が直接問題の分析器の中に向けてなされ、それによりとりわけ試料適用のための面倒なピペット取扱い操作をなくすることができるように多数のとがった先端のある装置を適合させることである。同じように重要なことであるが、これは核酸試料の固体支持体への吸着から脱着へ、又は支持体上の反応生成物の分析器例えば電気泳動ゲルに至るすべての処理のため、単一の又は一連の固相のセットを使用することを可能にする。このようなフォーマットは複雑な試料からの標的分子の分離から最終の分析工程に至る逐次反応工程を経

(6)

特表平8-503133

る多数の試料の平行及び連続移動を相当に簡略化し、その一方試料間の混同及び汚染の危険を実質的に減らし得ることが容易に認識される。

従って本発明は対応する1つ又は複数のセットの容器と協同するようにした多数の個々の固相要素を持つ1つ又は複数のマニホルドを準備し、試料からの核酸種を第一の1つ又は複数のマニホルドの各々の固相要素に、固相要素を前記1つ又は複数の試料を含む第一の容器又は容器のセットに導入することにより結合させ、場合により固相要素を第二の1つ又は複数のセットの容器に導入することにより、各々の核酸種をそれが固相要素に結合している間に処理し、場合により第二の1つ又は複数のマニホルドの固相要素を前記第一の

の容器に導入してそこに生成した1つ又は複数の種を固相要素に固定化し、そして固相要素を分析器の放出に必要な環境を与える1つ又は複数の試料容器に導入することにより、核酸種又は反応生成物を1つ又は複数のマニホルドの固相要素から分析装置へ核酸種又は反応生成物を分析するため放出する工程からなる、分析のための核酸(DNA又はRNA)試料の処理方法を提供する。

本明細書で使用する用語「分析器」は広義に解釈すべきである。従って、分析器は実際の分析装置である必要はなく、例えば着色反応を視覚などにより検出するマイクロタイターウェルのセットであってよい。

分析される材料のマニホルド固相要素から分析器への放出又は脱着のために必要な環境及び条件は放出される特定の種及び特定の分析器により変化する。例えば、ゲル電気泳動からなるDNA配列分析の場合、マニホルドはその固相要素が電気泳動ゲル板の試料ウェルに具合よく導入され、そこで合成された核酸鎖のウェル脱着が、例えばホルムアミド、熱及び/又はアルカリのような変性pHのような変性剤によりなされるように設計される。

固相要素は本発明の範囲内の種々の方法で得ることができる。1つの実施態様においては、それらはプレート要素の表面から伸びるとがった先端すなわちピンである。そのような系は、例えば慣用のタイプであってよい96ウェルのマイクロタイタープレートのウェルに差し込まれるようにした幾つかの例えば96のとがった先端を持つことができる。他の実施態様においては、マニホルドは例えば4つ

(7)

特表平8-503133

、8つ又はそれより多くのとがった先端を持つ櫛型要素である。適切には、マニホルドは2つ又はそれより多くのマニホルドを相互に接

続しそして1つが他の後ろにあるように一緒に組み合わせてとがった先端が数列をなすマニホルド集成体を作るか、及び／又は横並びの関係で相互に接続するように設計される。さらにもう1つの実施態様においては、固相要素は多数の反応容積をそれによって決める第二のプレート手段中のそれぞれの部分(例えば凹み)と協同するようにした第一のプレート手段の限定された表面部分である。

前記核酸種の固相要素への結合を可能にするため、それ自身核酸種と相互作用する能力のある分子又は基、又は核酸種に組み込まれる官能基又は分子を固相表面に固定化する。

前者の場合、固相表面はオリゴヌクレオチドを支持すること、例えば固相に共有結合することができ、このオリゴヌクレオチドは核酸種とハイブリッドを形成すること又はそれに結紮することが可能である。

後者の場合、核酸に組み込まれる官能基は特異的結合対の一員であることができ、他の一員は固相により支持されている。そのような結合対の例はビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、システイン-チオール基、抗原-抗体、レクチン-糖である。このような関係において特に有用な結合対はビオチン-アビジン(又はストレプトアビジン)である。DNAを固相に固定化するためそのような特異的結合対の使用は例えばWO 89/099282に記述されており、これはプラスミド又はファージベクターのDNA鎖の1つの中に官能基を選択的に組み込み、次いでこのベクターを固体支持体に官能基を介して直接固定化し、そしてその後非結合DNA鎖を適当な条件で選択的に溶解することによる配列決定目的のため一本鎖DNA鎖型の不溶性担体への固定化を開示している。

本発明の目的にとって、固相要素は表面を多孔質粒子でコートすることにより、増加した表面負荷を可能にする実質的に拡張された表面積を備えることができるので有利である。接着剤を使用することなく表面に粒子を付着させることを含む適当なコーティング方法は本出願人の同時に出願した「表面改質の方法」とい

(8)

特表平8-503133

う名称の国際特許出願(PCT)(スウェーデン特許出願9203319-0に基づく)に記述されており、その開示は参照により本明細書に組み入れる。そのような固相要素の粒子コーティングは意図する目的にとって十分な結合能力の達成を容易にもたらすものである。

上述の標的分子を固相要素へ固定化するための「釣り上げ」処理法は簡単で能率のよい核酸分子の精製及び/又は極めて複雑で粗製の試料からでさえ特定の標的分子の富化を可能にし、特別な精製工程をなくするものである。

一般の態様においては、本発明の方法は次の工程：(i) 試料採取；(ii) 所望の核酸物質の選択及び任意の増幅；(iii) 核酸物質の任意の処理；及び(iv) 分析装置(分析器)例えば電気泳動ゲルの適用からなり、その間に適当な洗浄を挿入することができる。

選択は典型的には問題の核酸物質例えばDNAの一本鎖が、固相に固定化され得るもう一つの分子に選択的且つ強力に結合するような特異的化学基を持つか又は供給されるように行う。そのような相互作用する分子又は基、すなわち特異的結合対の例は既に上で述べたピオチンーストレプトアビジン及び2つのハイブリッドを形成するか又は結紮する一本鎖DNA分子である。従って固相及び標的分子の間の相互作用は非共有結合だけでなく共有結合の型のこともある。

特異的化学基は、例えば問題の核酸物質の鎖の一本に相補的であり、そして5'-末端に特異的化学基を与えられたオリゴヌクレオチド(プライマー)を作ることにより導入することができる。次いでこのプライマーはその相補的な鎖とハイブリッドを形成し、その後4つのヌクレオチド(dNTP)及びDNA依存性ポリメラーゼの存在下で伸長させることができる。そのプライマーを第二のプライマーと組み合わせると、それ自体この技術分野で公知の例えばPCRによる同時の増幅及び選択を達成することができる。

このように特異的化学基で末端標識した核酸物質は次いでマニホールドの固相要素に結合させることができ、この固相要素は各々上述のプライマーの特異的化学基と相互作用することができる分子又は基、すなわち特異的結合対の他の要素を支持する。この方法により、選択並びに富化及び能率のよい洗浄の可能性が得ら

れる。

ある場合にはマニホールドを連続して使用することができる。例えば、第一のマニホールド(又はセット)を標的分子を複雑な試料から釣り上げるために使用することができる。次いで固定化された分子を処理して反応溶液中に1つ又は複数の所望の種を生成させることができる。次いでこの1つ又は複数の種を第二のマニホールド(又はセット)に固定化してさらに上述のように処理することができる。場合により、この操作を異なるマニホールド(又はセット)を使用して1回又は複数回繰り返し、結局1つ又は複数の所望の種を分析することができる。

マニホールドは上述のように、例えば櫛型手段、とがった先端又は歯であることができ、この物は前記固相要素を代表しそして適当な表面特性(親水性、利用可能な表面積など)並びに上述の所望の相互

作用基を有している。

上述のように結合した核酸物質は、次いで所望により、固相要素又はとがった先端を適当な内容物のあるウェルの中に導入することにより種々な化学的環境に当てることができる。個々のとがった先端は共通の担体と一体であるから、所望の数の個々のとがった先端をそれぞれ動かし、そしてそれぞれのウェルの中に導入することにより個々に処理することができる。典型的には、この処理は各々の固定化された核酸物質(櫛型)上に相補的分子を合成することからなる。次にこれらの相補的分子をそれぞれのとがった先端から、それを適当な環境に当てることにより脱着し、これに直接つなげてこれらのはずされた相補性分子について引き続き分析を行う。例えばゲル電気泳動の場合、マニホールド例えば既述の櫛型手段は、異なる固相要素又はとがった先端が電気泳動ゲル板のウェルの中に差し込まれて、そこで脱着過程が起こるように設計される。

マニホールド及び容器セットについては、ここで添付の図面を参照しながら説明する。すなわち

図1は櫛型マニホールドの正面図であり、

図2は2つの長く伸びたウェルを持つウェルストリップの断面略図であり、

図3は図2のウェルストリップの上面略図であり、

(10)

特表平8-503133

図4は8つのウェルを持つウェルストリップ断面略図であり、

図5は図4のウェルストリップの平面略図であり、

図6は分析装置の試料ウェルと共に整列させた図1のマニホルドを示す正面略図であり、そして

図7は4つのセット及びウェルの3つに異なるセットの透視略図

である。

櫛型マニホルドは図1に略図を以て、表示番号1により概略的に例示され、この物は8つのとがった先端又は歯2を持つ。歯2の形及びそれらの間隔は電気泳動装置の試料ウェルに合わせてあり、これについては以下でより詳しく説明する。図において、歯2はシェーディング3で示すように誘導体化されており、例えば本出願人の前述の同時係属中の国際特許出願(PCT)及び下記の実施例1に既述するようにアビジン結合粒子でコートされている。

マニホルド1は対応するウェルセットと協同するように設計されており、ウェルセットの2つの異なる態様はそれぞれ図2、3及び4、5に示す。図2及び3のウェルセットは2つの長く伸びたウェル4を持ち、各々は4つのマニホルドの歯2を受け容れることができる。例示の場合においては、ウェル4は試薬溶液5で部分的に満たされている。一方、図4、5に示すウェルセットの態様は8つの個々のウェル6を持ち、各々のウェル6は単一のマニホルドの歯2を受け容れるようにしてあり、そしてここでも試薬溶液7で部分的に満たされている。

上述のように、マニホルド1は分析装置の試料ウェルと協同するようにしてある。これは図6に略図で例示されており、ここではマニホルド1は表示番号8で概略的に示す電気泳動装置の上に置かれ、そして歯2が電気泳動装置のそれぞれの試料ウェル9と共に整列されそして受け容れられるようになっている。

上述のマニホルド及びウェルセットを使用するチェーンターミネーション又はジデオキシ法によるDNA配列決定は下記のように行うことができる。

マニホルド1は図1に3で示すようにその歯2にストレプトアビジンが固定化されている。最初に、所望のDNA配列の上のPCRをそれ自体慣用的な方式で

(11)

特表平8-503133

1つのビオチン標識プライマー及び1つの非標識プライマーを使用して、図2及び3のウェルストリップの各々の長く伸びたウェル4で行う。次いで、マニホルド1のストレプトアビジンをコートした歯2をウェル4の反応混合物5の中に導入してそれぞれのビオチン標識PCR反応生成物をそれに結合させる。すなわち、例示の場合においては、第一のPCR反応生成物を4つの隣接する歯の一つのセットに、そして第二のPCR反応生成物を4つの歯の他のセットに結合させる。次いで各々の二本鎖DNA断片の一本の鎖は歯を変性条件、例えば加熱及び/又はアルカリ処理にかけることにより溶解して除く。所望により、一本鎖DNAの変性は固相への固定化の前、反応完了後に既にPCR反応混合物において行うことができる。

2つのウェル4から歯を除き、そしてもう一つのウェルのセットにおける迅速洗浄工程において、又は他の手段により非結合DNA鎖及び他の反応成分を除いた後、マニホルドの歯2を反応溶液5を含む図2及び3に示すタイプの第二のウェルストリップのウェル4に導入して標識したプライマー（例えば着色した又は蛍光を発する尾部）をマニホルドの歯2に結合した一本鎖DNA断片又は鋳型とハイブリッド形成させる。又は、その後の伸長反応工程で使用するdNTP又はddNTPをプライマーの代わりに標識することができる。

次いでマニホルド1をウェルストリップから除きそして迅速洗浄後、その歯2を図4及び5に示すウェルストリップの8つの個々のウェル6に導入し、4つのウェル6の各々のセットは各々のウェル

にそれぞれのジデオキシヌクレオチド(ddNTP)と共に逐次反応混合物7を含み、それ自体公知の方法で固相-結合鋳型上のヌクレオチド重合を可能にする。

マニホルドの歯2を洗浄後、マニホルド1を図6に示すように電気泳動装置8に移しそして一緒に整列させ、そしてマニホルドの歯2を電気泳動装置8の試料ウェル9の中に導入する。試料ウェル8は各々のマニホルドの歯2が担持する鋳型からのジデオキシ転写終結した伸長生成物の混合物の脱着を果たすための適当な薬剤溶液、例えばホルムアミドを含む。数分間の脱着後、マニホルド1をウェル9から引き上げ、そして電気泳動操作を開始する。

(12)

特表平8-503133

図7は数個の、ここでは4つのマニホルドのセット10を例示し、各々は4つの歯11を持つ。マニホルド10は適当な手段(図示しない)により、隣接するマニホルドの歯11が互いに接触することなく、すべての4つのマニホルドが単一ユニットとして取り扱えるように一緒に組み合わせることができるように設計されている。図7においては、マニホルドセットは長く伸びたウェル13の対応するセット12の上で一緒に整列され、各々のウェル13は1つのマニホルド10のすべての4つの歯を受け容れるようになっている。そこには各々のマニホルドの歯11のためのそれぞれのウェル15を持つ第二のウェルセット14も示されている。最後に第三のウェルセット16が示され、この物は各々が組み合わされたマニホルドセットのそれぞれの歯列(各々のマニホルド10の1つの歯11からなる)を受け容れるウェルセット12のウェル13に対して横方向に配置された4つの長く伸びたウェル17を持つ。

図7に示すマニホルド/ウェルセットを使用して上述の配列決定

操作を行うには、マニホルド10の歯11を、対応するPCR増幅用混合物を含むそれぞれのウェル13の中に浸すことにより所望のDNA断片をその歯に固定化する。次いで配列決定反応をウェルセット14のウェル15(上述の図4及び5のウェルセットのウェル6におけると同様に)、又はウェルセット16のウェル17のいずれかで行うことができる。後者の場合、4つの配列決定反応(A, C, T及びG反応)の各々の1つをマニホルド集成体の組み合わされた歯11のそれぞれの列で同時に行うことができる。この態様から反応溶液を異なるウェルへ分注するために必要な操作の数を著しく減らすことができることは容易に分かることである。

上述のような単一標識したプライマーを使用するより、むしろそれ自体この技術分野で公知の4つの異なる標識を付したプライマー又は4つの異なる標識を付したジデオキシ転写終結剤のいずれかを使用することも可能である。標識したプライマーを使用する場合、4つの配列決定反応を4つの別々の歯で進行させ、次いで反応混合物を合せて、例えば自動蛍光読み取り器で読み取る。この場合、個々のウェルはもちろん、各々のマニホルドの歯について異なるプライマーをマニホルド固定化DNA鋳型とハイブリッド形成させるために使用されねばならない。一方標識した転写終結剤の場合、すべて配列決定反応は単一のマニホルドの歯

で行うことができる。

都合よく、マニホールド及びウェルセットはキット形態で提供することができ、これは好ましくは必要な試薬成分をウェルの中及び／又は固相要素上で乾燥状態で存在させる。乾燥状態反応混合物のより詳しい記述については、例えばEP-A 2 98 669, EP-A 383 569及びUS-A-4,891,319を参照することができる（その開示は参照により本

明細書に組み入れる）。

下記に本発明を実施例により示すが、これらに限定されるものではない。

実施例 1

A. アビジンのセファロース®粒子への結合

6.0mlの沈降物質に相当するセファロース®(Sephacrose)粒子
(HiTrap®, NHS-活性化 Sepharose® HP, Pharmacia LKB Biotech-

nology AB, Uppsala, Sweden)を焼結漏斗上で氷冷した1mM HCl(3

×10ml)で注意深く洗浄し、セファロース®表面が決して乾燥しないようにした。粒子を1.0M NaCl及び0.4M NaHCO₃の溶液で迅速に洗浄し、pH8.3に緩衝化し、そして10mgのアビジンを含む最終液量5mlの上記緩衝液に移した。懸濁液を1時間エンドオーバーエンド回転(end-over-end rotating)させながらインキュベートし、濾過し、そして粒子をpH8.3の0.1Mエタノールアミン緩衝液中で15分間

ブロックした。次いでアビジン結合セファロース®粒子をpH4.0の

0.1M酢酸緩衝液で洗浄し、そして直ちに使用するか又は0.02%(w/v)のナトリウムアジドを添加したpH7.3の0.05Mトリス緩衝液に保存した。

B. 粒子のポリスチレン固体支持体への付着

のように調製したアビジン結合粒子を濾過し、蒸留水で洗浄し、メタノール(3×5ml)で乾燥し、次いでトリエチルアミン(Et₃N; 3×5ml)を用いて平衡化した。固体を迅速に適切な容器に移し、そしてEt₃Nを添加して約75%(v/

(14)

特表平8-503133

v)の粒子のスラリーを作った。対応するマイクロタイタープレート (F.A.S.T. システム, Falcon, Oxnard, California, U.S.A.) の個々のマイクロタイターウェルの

中に突出するようにした8列の12ピンアンドボールの抜きを持つマイクロタイタープレートのふたの形に作ったポリスチレン支持体を超音波浴中でエタノールで20分間洗浄し、次いで粒子をポリスチレン支持体からの突起の上にスラリーに2回各々2秒間浸漬することによりグラフトさせ、その後直ちに残存Et₃Nを空气中で蒸発させた。脱イオン水で洗浄後、結合しなかった粒子を集め、再使用した。ゆるく結合した粒子は水中で振盪しながら10分間インキュベートして除いた。マニホールドは使用するまで緩衝液 (1 M NaCl, 100mM トリス-HCl (pH7.5)、及び0.1% (v/v) Triton X 100、さらに無脂肪乾燥乳0.5% (w/v) 及びナトリウムアジド0.02%を添加) 中に保存した。

ビオチンで5'-末端を修飾した³²P-標識オリゴヌクレオチドを使用するアビジンをコートした支持体の結合能力の試験により、支持体の各々のとがった先端は20pmolの程度のビオチニル化オリゴヌクレオチドを結合し得ることが示された。

実施例 2

図1に示す型の櫛型ポリスチレンマニホールドの歯を上の実施例1で記述したのと同じ方法で、アビジンを結合させたビーズを歯の先端から約5mmまでコートした。

次いでDNAジデオキシ配列決定反応を実質的にHultman等, NAR, 17: 4937~4946 (1989) により記述された標準プロトコルにより、最初に5'-ビオチニル化鎖型の鎖をマニホールドの歯の上にトラップしそして精製し、次いでマニホールドの歯を適当な反応媒質を含むウェルに浸すことにより行った。

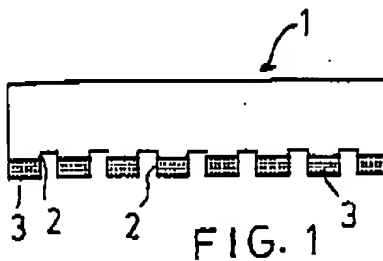
配列決定反応が完了した後、マニホールドの歯をA.L.F.TM DNA

Sequencer (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) の配列決定用ゲルのウェル、すなわちホルムアミドを含むウェルの中に導入した。歯はホル

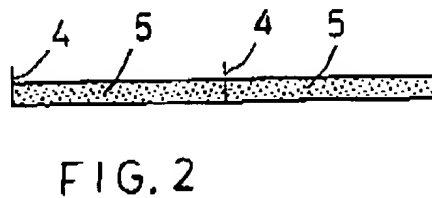
ムアミド中に室温で5分間浸漬したままに置いた。次いで電気泳動を開始し、そしてさらに5分後に停止し、その時マニホールドを除いた。その後電気泳動をそれ自体慣用的な方式で継続し、進行させた。配列読み取りによりジデオキシ転写終結した反応断片の有効な脱着及びゲル分離が試料ウェル中で起こったことが示された。

本発明はもちろん、上で詳しく説明しそして図面に示した態様に限定されるものではなく、多くの改変及び変更を添付の特許請求の範囲に明確に示した一般の発明の概念の範囲から逸脱することなく行うことができる。

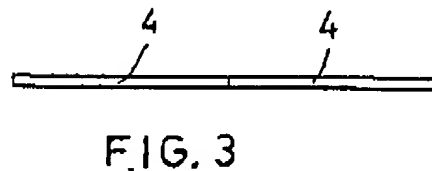
【図1】



【図2】



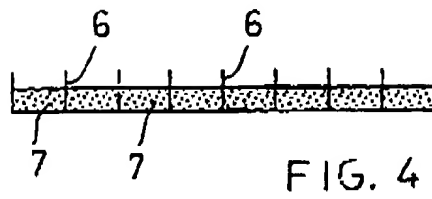
【図3】



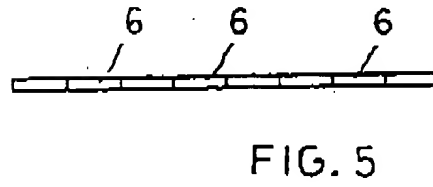
(16)

特表平8-503133

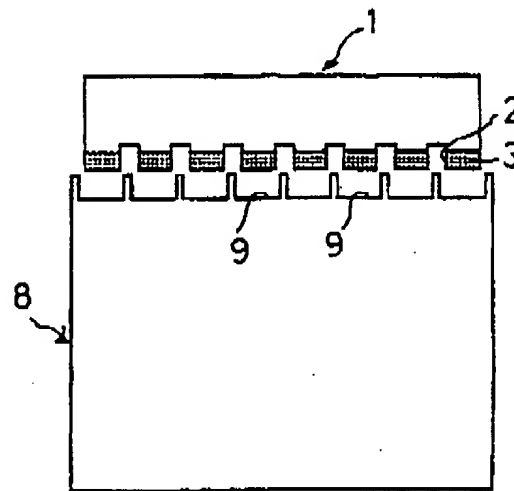
【 図 4 】



【 図 5 】



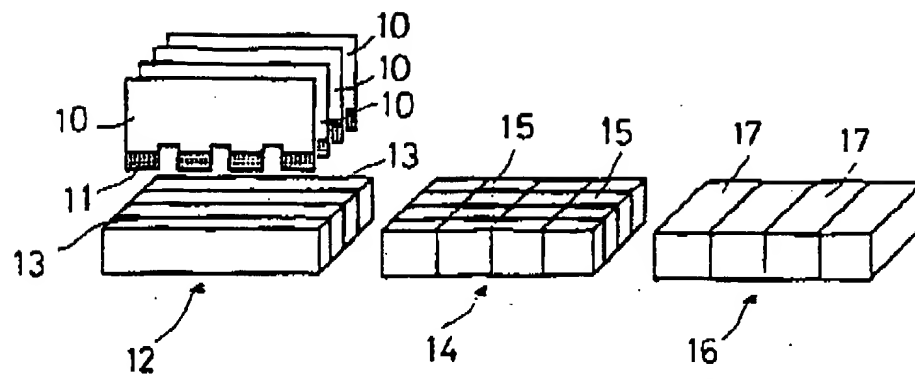
【 図 6 】



(17)

特表平8-503133

【 7 】



(18)

特表平 8-503133

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 93/00929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPCS: C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPCS: C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, WPI, CLAIMS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category** Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.

Y	DD, A, 279506 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR), 6 June 1990 (06.06.90), cited in the application	1-10
Y	EP, A1, 0102661 (KATHOLIEKEUNIVERSITEIT), 14 March 1984 (14.03.84), see the whole document	1,5-10
Y	EP, A2, 0184056 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.), 11 June 1986 (11.06.86), see the whole document	1-2
A		3-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* prior document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underpin the principles or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 February 1994

Date of mailing of the international search report

92-02-494

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Jonny Brun
Telephone No. +46 8 782 25 00

(19)

特表平8-503133

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 93/00929

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Patent Abstracts of Japan, Vol 13, No 331, C-622, abstract of JP, A, 1-108999 (TOSOH CORP), 26 April 1989 (26.04.89) -----	1,3-4

(20)

特表平8-503133

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

28/01/94

International application No.

PCT/SE 93/00929

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD-A- 279506	06/06/90	NONE	
EP-A1- 0102661	14/03/84	AU-A- 1754083	09/02/84
		JP-A- 59048081	19/03/84
		NL-A- 8203102	01/03/84
EP-A2- 0184056	11/06/86	SE-T3- 0184056	
		CA-A- 1264452	16/01/90
		JP-A- 61227785	09/10/86
		US-A- 4734363	29/03/88

Form PCT/ISA/21C (patent family annex) (July 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.